

氏 名	中 崇
学 位 の 種 類	博士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 6008 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学 位 論 文 名	Lipid Phenotype of Two Distinct Subpopulations of <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 Substrain (結核ワクチン BCG Tokyo 172 株に混在する 2 つのサブポピュレーションの脂質表現型)
論文審査委員	主 査 小倉 壽 教授                      副 査 森田 隆 教授 副 査 平田 一人 教授

## 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】日本の結核ワクチンである BCG Tokyo 172 株には、コロニー形態が異なる 2 つのサブポピュレーション I (smooth) 型と II (rough) 型が混在し、I 型は RD16 領域の *Rv3405c* 遺伝子が 22bp 欠失していること、I 型は II 型よりも優位に増殖することが 2006 年に報告された。BCG を始めとする抗酸菌は、ユニークな脂質成分を多量に含有することが特徴であり、この脂質成分は抗原性、薬剤抵抗性、コロニー形態に関与する。本研究では、I, II 型のコロニー形態の相異が脂質成分に起因すると仮定し、脂質生化学的側面から I, II 型の脂質表現型を網羅的に比較することにより、BCG Tokyo 172 株の性状を明らかにすることを目的とした。

【方法】走査型電子顕微鏡による形態観察、薄層クロマトグラフィー (TLC) と各種質量分析 (MALDI-TOF/MS、GC/MS) による脂質解析を行った。また、phenol glycolipid (PGL) と phthiocerol dimycocerosate (PDIM) の生合成遺伝子群 *ppsA-E* を解析し、I, II 型の各 *ppsA* を挿入した形質転換株によって PGL の発現を検証した。さらに、マウス骨髄由来マクロファージを用いて I, II 型の菌体脂質による宿主免疫応答を検討した。

【結果】形態観察では、I 型の平均菌体長が II 型の約 1.5 倍あり、顕著な違いが認められた。菌体脂質の解析により、II 型の PGL, PDIM が欠損していることが明らかになった。また、生合成遺伝子と形質転換株の解析によって、II 型の PGL, PDIM の欠損は、II 型 *ppsA* 内の 1 塩基挿入によるフレームシフトが原因であることが判明した。宿主免疫応答では、PGL にはマクロファージによる宿主応答は認められなかったが、総脂質画分によるマクロファージの活性化を PGL は抑制した。

【結論】本研究の成果は、BCG Tokyo 172 株の免疫原性・ワクチン効果等に影響する重要な因子であることが示唆された。今後、結核ワクチンを論じる上で重要な知見であると考えられる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

BCG ワクチン株は、牝ウシの結核性乳腺炎から分離された強毒性のウシ型結核菌が繰り返し継代培養され病原性を失った馴化菌株である。1924 年以降、パスツール研究所の Calmette によって世界各国に分与され、各国独自の方式による継代培養の結果、オリジナル株と細菌学的性状の異なる十数種の BCG 亜株が世界に存在する。日本の結核ワクチン BCG Tokyo 172 株は、他国の BCG ワクチン株よりも力価が高く、熱安定性にも優れ、WHO の国際参照品に採択されている。2006 年、BCG Tokyo 172 株にコロニー形態が異なる 2 つのサブポピュレーション I (smooth) 型と II (rough) 型が混在し、I 型は RD16 領域の一部が欠失していることが報告されたが、ワクチンの有効性・安全性の観点から I, II 型の性質をより明確にする必要が生じた。

本研究は、BCG 菌を始めとする抗酸菌に特徴的な脂質成分が抗原性、薬剤抵抗性、コロニー形態に関与することに着目し、脂質表現型を比較検討することにより、BCG Tokyo 172 株 I, II 型の脂質生化学的性状の相違点を明らかにした。

走査型電子顕微鏡による形態観察では、平均菌体長がⅠ型はⅡ型の約 1.5 倍あり、有意な差を認めた。総脂質画分の解析では、BCG 菌に特徴的な脂質成分である phenol glycolipid (PGL) と phthiocerol di-mycocerosate (PDIM) をⅡ型が欠損していることを明らかにした。また、PGL と PDIM の生合成遺伝子群 *ppsA-E* の解析によって、Ⅱ型の PGL, PDIM の欠損は、Ⅱ型 *ppsA* 遺伝子内における 1 塩基挿入によるフレームシフトが要因であることを立証した。さらに、PGL による宿主免疫応答では、PGL 自身は直接的にマウス骨髄由来マクロファージを活性化しないが、総脂質画分によるマクロファージの活性化を抑制することを明らかにした。この PGL による宿主免疫応答の抑制作用は、BCG 菌が宿主の免疫機構から回避し、長期に免疫原として生存できることを示唆した。

本論文は、日本の結核ワクチン BCG Tokyo 172 株の性状をより明確に示し、免疫原性・ワクチン効果等に影響する重要な因子を明らかにしたものであり、今後、結核ワクチンの有効性を論じる上で重要な知見を与える基礎的研究であると考えられる。

よって、本研究は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。